

学 位 論 文 題 名

シカクマメ Kunitz 型キモトリプシンインヒビター
遺伝子の発現調節機構の解析

学位論文内容の要旨

植物における遺伝子発現の時間的および空間的な制御機構の解析は、植物の成長および分化の分子機構を知る上で非常に意義深いと考えられる。しかしながら、植物遺伝子の時間的および空間的な発現制御機構については未だ詳細な情報は得られていない。本論文では種子および塊根という2つの栄養貯蔵器官に特異的に蓄積するマメプロテアーゼインヒビター遺伝子の発現調節機構を解析し、植物遺伝子の発現調節機構に関する知見を得ることを目的としている。

熱帯産マメ科植物であるシカクマメはその植物体の各組織がタンパク質に富む上、通常のマメ科植物とは異なり塊根を形成する。このようなことから、シカクマメは熱帯地方の諸国におけるタンパク質資源として注目されている。このシカクマメの種子と塊根にはタンパク質性のプロテアーゼ阻害物質であるキモトリプシンインヒビター (winged bean chymotrypsin inhibitor: WCI) が蓄積する。マメ科植物には分子量約20,000のKunitz型と、分子量約8,000のBowman-Birk型の2種類のセリンプロテアーゼインヒビターが知られているが、WCIタンパク質はKunitz型に属するキモトリプシンインヒビターである。WCIタンパク質の生物学的機能は未だ明かではないが、虫害に対する防御物質である可能性が考えられている。

WCIタンパク質の発現は器官特異的であることに加えて、種子では成熟中期から後期にかけてのみ発現するという時期特異性を併せ持っている。WCIタンパク質をコードする遺伝子の時期および器官特異的な発現制御機構の解析は、植物の分化に伴う遺伝子発現を制御している分子機構に多くの知見を与えるものと期待される。真核生物における遺伝子発現はプロモーター上のDNAシグナルであるシス因子と、これを識別して特異的に結合するタンパク質因子の相互作用によって制御され则认为られている。本論文では、WCI遺伝子の構造解析および発現解析を行い、その発現制御に関わるシス因子およびこれと特異的に結合するタンパク質因子の同定を行っている。本論文の内容は以下の3つに要約される。

1. WCIは偽遺伝子を含む7種以上から成る多重遺伝子族を形成しており、このうち最も主要な分子種であるWCI-3タンパク質はきわめて相同性の高い2つの遺伝子、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子によりコードされていることを明らかにした。

WCI多重遺伝子族を構成する各WCI遺伝子の5'上流域を大腸菌由来のレポーター遺伝子である β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子につないだキメラ遺伝子をタバコに導入し、得られた形質転換タバコにおけるGUS活性の測定を行った。その結果、1つの偽遺伝子を除いて、全ての遺伝子の5'上流域は種子特異的にGUS活性の発現を誘導した。このうち、シカクマメにおいて最も発現量の多いWCI-3遺伝子の5'上流域のみがタバコ種子の胚において、シカクマメの種子における発現と同様の時期特異的なGUS活性の発現を誘導した。

以上のことから、WCI遺伝子の時期および器官特異的な発現は転写レベルで制御されていること、およびその器官特異的な発現を制御するシス因子はWCI遺伝子族に共通して存在する領域、すなわち転写開始点を含む約100塩基対の領域に存在する可能性が示された。また、WCI-3遺伝子の5'上流域には器官特異性に加えて、種子の胚における時期特異的な転写の活性化に関わるシス因子が存在することが示された。

2. WCI-3遺伝子の5'上流域に存在する、種子の胚における時期特異的な転写の活性化に関与するシス因子を同定するため、WCI-3遺伝子の5'上流域を様々に欠失させたプロモーターをGUS遺伝子に融合し、形質転換タバコにおけるプロモーター活性を解析した。その結果、WCI-3遺伝子の時期特異的な転写の活性化には上記の100塩基対の領域に加えて、転写開始点の上流882から623塩基対に位置するAT塩基対に富む領域および種子特異的に発現する遺伝子に共通して存在するRY配列と呼ばれる領域が必要であることが示された。

このようなシス因子の同定に一過的発現系を用いることができれば、より迅速な解析が可能となる。そこでパーティクルガン法を用いた一過的発現系を用いることの妥当性を検討した。その結果、パーティクルガン法によりシカクマメ成熟中期の胚に導入したWCI-3遺伝子の一過的発現には、形質転換タバコ種子における解析から明らかになった転写開始点の上流882から623塩基対の領域は重要な機能を持たないことが明らかとなった。以上のことから、シカクマメ成熟中期種子に導入されたWCI-3遺伝子の一過的発現は、形質転換タバコにおける発現とは部分的に異なる機構で行われていることが明らかとなった。遺伝子発現の制御において、クロマチン構造が重要な役割を持つことが近年指摘されている。パーティクルガン法では、クロマチン構造を持たない裸のDNAが大量に導入されるためにWCI-3遺伝子本来の発現制御機構が働かなくなったものと考えられた。

3. シカクマメの核抽出物を用いてWCI-3遺伝子プロモーター断片をプローブにしてゲルシフト解析を行うと、2種類の移動度の異なるバンドが観察される。このことは、シカクマメの核にはWCI-3遺伝子プロモーターに結合するタンパク質因子が少なくとも2種類存在することを示している。また、これら因子はシカクマメの種子および塊根に加えて、葉の細胞にも存在していた。このうち、移動度の大きいDNA-タンパク質複合体（バンド3）を形成する因子（バンド3形成因子）の結合するプロモーター領域は、タバコ種子における転写活性を調節している領域と重複して存在していた。このことから、このバンド3形成因子がWCI-3遺伝子の発現調節に関与している可能性が考えられた。

バンド3形成因子の機能を明らかにするため、サウスウエスタン法により、この因子をコードするcDNAをシカクマメ葉のcDNAライブラリーよりクローニングを行った。約100万個の組み換え体ファージをスクリーニングした結果、1個の陽性クローンが得られた。結合特異性の解析から、このクロンのコードするタンパク質はバンド3形成因子と同様のDNA結合特異性を持つことが示された。塩基配列の解析より、このcDNAはホメオドメインと金属結合ドメインを併せ持つDNA結合タンパク質をコードすることが明らかとなった。ホメオドメインはショウジョウバエの形態形成に関わる遺伝子がコードするDNA結合ドメインである。この型の遺伝子のクローニングは、植物として5個目であり、マメ科植物としては初めてである。このクローンがコードするタンパク質をシカクマメホメオドメインタンパク質（winged bean homeodomain protein : WBHD1）と命名した。シカクマメのゲノムDNAの解析から、WBHD1をコードする遺伝子は1~2コピーで存在していることを明らかにした。WBHD1の結合特異性の解析および推定される分子量から、WBHD1は、シカクマメ中に普遍的に存在し、WCI-3遺伝子プロモーターに結合するバンド3形成因子を構成するタンパク質であると推定された。

以上、本論文によりマメ科植物のプロテアーゼインヒビター遺伝子の転写レベルにおける発現を制御しているプロモーター領域およびシス因子が明らかになった。また、マメ科植物プロテアーゼインヒビター遺伝子のプロモーターに結合するタンパク質を初めてクローニングし、その構造を明らかにした。これらの成果は植物遺伝子が異なる器官において特異的に発現するために持っている制御機構の解明に大きな前進をもたらすものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 哲
副 査 教 授 富 田 房 男
副 査 教 授 島 本 義 也
副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

シカクマメ Kunitz 型キモトリプシンインヒビター 遺伝子の発現調節機構の解析

本論文は3章からなり、図37、表2、引用文献71を含む総頁数91の和文論文である。別に参考論文3編が添付されている。

熱帯産マメ科植物であるシカクマメはその植物体の各組織がタンパク質に富んでいる上、マメ科植物としては珍しく塊根を形成する。このようなことから特に熱帯地方におけるタンパク質資源として注目されている。シカクマメの種子と塊根にはキモトリプシンインヒビター (winged bean chymotrypsin inhibitor, WCI) が蓄積する。マメ科植物にはKunitz型とBowman-Birk型の2種類のプロテアーゼインヒビターが知られているが、WCIタンパク質はKunitz型に属するプロテアーゼインヒビターである。

WCIタンパク質をコードする遺伝子は器官特異的に発現することに加えて、種子の成熟中期から後期にかけてのみ発現するという時期特異性を併せ持っている。WCI遺伝子の時期および器官特異的な発現制御機構の解析は、植物の分化に伴う遺伝子発現を制御している分子機構に多くの知見を与えるものと考えられる。真核生物における遺伝子発現はプロモーター上のDNAシグナルであるシス因子と、これを識別して特異的に結合するタンパク質因子の相互作用によって制御され则认为されている。本論文では、WCI遺伝子の構造解析および発現解析を行い、その発現制御に関わるシス因子およびこれと特異的に結合するタンパク質因子の同定を行っている。その概要は以下の通りである。

1. WCI遺伝子は偽遺伝子を含む7種以上から成る多重遺伝子族を形成しており、このうち最も主要な分子種であるWCI-3タンパク質は極めて相同性の高い2つの遺伝子、WCI-3aおよびWCI-3b遺伝子によりコードされていることを明らかにした。多重遺伝子族を構成する各WCI遺伝子のプロモーター領域をレポーター遺伝子につないだキメラ遺伝子をタバコに導入し、得られた形質転換タバコでの発現解析を

行った。その結果、*WCI*遺伝子の時期および器官特異的な発現は転写レベルで制御されていることを明かにし、また、その器官特異的な発現を制御するシス因子は転写開始点に近接する約100塩基対の領域に存在すると推定された。また、*WCI-3*遺伝子のプロモーター領域には器官特異性に加えて、種子の胚における時期特異的な転写の活性化に関わるシス因子が存在することが示された。

2. *WCI-3*遺伝子のプロモーター領域を様々に欠失させてレポーター遺伝子と融合させ、形質転換タバコにおけるプロモーター活性を解析した。その結果、*WCI-3*遺伝子の時期特異的な転写の活性化には転写開始点に近接する約100塩基対の領域に加えて、転写開始点の上流882から623塩基対にわたる領域と、種子特異的に発現する遺伝子に共通して見いだされるRY配列と呼ばれる部分が必要であることが示された。

3. シカクマメの核には*WCI-3*遺伝子プロモーターに結合するタンパク質因子が少なくとも2種類 (band-1およびband-3形成因子) 存在する。これらの因子はシカクマメで*WCI*タンパク質の蓄積が見られる種子および塊根に加えて、葉においても存在していた。このうち、band-3形成因子の結合するプロモーター領域は、上記の転写活性を調節している領域と重なっており、このband-3形成因子が*WCI-3*遺伝子の発現調節に関与している可能性が考えられる。この因子をコードするcDNAのクローニングを行い、サウスウェスタン法によるcDNAライブラリーのスクリーニングにより1個の陽性クローンを得た。得られたクローンの塩基配列を解析した結果、このcDNAはホメオドメインと金属結合ドメインを併せ持つDNA結合タンパク質をコードすることが明らかとなった。この型の遺伝子のクローニングは、植物として5個目であり、マメ科植物としては初めてである。このクローンがコードするタンパク質を、シカクマメ ホメオドメイン タンパク質 (winged bean homeodomain protein, WBHD1) と命名した。WBHD1タンパク質の結合特異性の解析および推定される分子量から、WBHD1タンパク質はband-3形成因子を構成するタンパク質であると考えられた。

以上、本論文によりシカクマメのプロテアーゼインヒビター遺伝子発現の転写レベルにおける調節を制御しているプロモーター領域およびシス因子が明らかになった。また、マメ科植物プロテアーゼインヒビター遺伝子のプロモーター領域に結合するタンパク質を初めてクローニングし、その構造が明らかにされた。これらの結果はシカクマメプロテアーゼインヒビター遺伝子の発現制御のみならず植物遺伝子が異なる器官において発現するために持っている制御機構の解明に大きな前進をもたらすものと考えられる。よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者 坂田 洋一 は博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。